

**Re: Application No. 10/588,323
Magilavy et al.
Information Disclosure Statement
filed August 31, 2007**

**Cited References
B21 - B30**

DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing lymphocyte function associated antigen-3

Publication number: JP2501113T

Publication date: 1990-04-19

Inventor:

Applicant:

Classification:


- international: G01N33/53; C07H21/04; C07K14/00; C07K14/435; C07K14/705; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; C12R1/19; C12R1/91; G01N33/53; C07H21/00; C07K14/00; C07K14/435; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; (IPC1-7): C07H21/04; C07K13/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12P21/02; G01N33/53

- european: C07K14/705B22; G01N33/569H2

Application number: JP19880505208 19880603

Priority number(s): US19870057615 19870603

Also published as:

 WO8809820 (A1)
 EP0315683 (A1)
 US4956281 (A1)
 HU211627 (A9)
 EP0315683 (A4)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2501113T

Abstract of corresponding document: US4956281

Polypeptides that bind to CD2, the receptor on the surface of T-lymphocytes. Most preferably, the polypeptides bind to CD2 on the surface of T-lymphocytes and inhibit adhesion between T-lymphocytes and target cells. DNA sequences that code on expression in appropriate unicellular hosts for those polypeptides. Methods of making and using those polypeptides in therapy and diagnosis.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願

⑫ 公表特許公報(A)

平2-5(

⑬ 公表 平成2年(1990)

⑭ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分)

C 12 N 15/12

ZNA

8318-4H*

C 07 H 21/04

C 07 K 13/00

(全

⑮ 発明の名称 DNA配列、組換えDNA分子及びリンパ球機能-会合した抗原-3の製造方法

⑯ 特 願 昭63-505208

⑰ 翻訳文提出日 平1(1989)2月2

⑱ 出 願 昭63(1988)6月3日

⑲ 国 際 出 願 PCT/US88/01624

⑳ 国際公開番号 WO88/09820

㉑ 国際公開日 昭63(1988)12月15

優先権主張 ㉒ 1987年6月3日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 057,615

㉕ 発 明 者 ウォルナー、バーバラ ビー アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジ
ター ストリート 7

㉖ 出 願 人 バイオジェン インコーポレイ アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ
ラッド ブリッジ センター 14

㉗ 代 理 人 弁理士 浜田 治雄

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), (
特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲:

1. (a) フォーリス HT14中に担持されるDNA挿入断片;

(b) 前記DNA挿入断片に対して12以下の約20-17
に相当する条件下にハイブリッド形成し、かつCD2、T-リ
ンパ球の表面上のレセプターに結合するポリペプチドに対す
る発現上にコード付けするDNA配列; 及び

(c) 前記DNA配列又は挿入断片のどれかにより
発現に対して発現上にコード付けされたポリペプチドに相
する発現上にコード付けするDNA配列
から成る群から選択されたDNA配列。

2. 前記DNA配列(b)がT-リンパ球の表面のCD2に結合
し、かつT-リンパ球と標的細胞との結合を防止するポリペ
プチドに対する発現上にコード付けする請求項1記載のDNA配
列。

3. 前記ポリペプチドが可溶性である請求項1記載の
DNA配列。

4. 前記DNA配列が、第3図の式H₁, ..., H_nのDNA配列、
第3図の式H₁, ..., H_nのDNA配列、第3図の式H₁, ..., H_nのDNA配列、
第3図の式H₁, ..., H_nのDNA配列、第3図の式
ATG-H₁, ..., H_nのDNA配列、第3図の式ATG-H₁, ..., H_nのDNA配列、

5. 前記DNA配列が、第3図の式H₁, ..., H_nのDNA配列、
第3図の式ATG-H₁, ..., H_nのDNA配列及び前記DNA配列の
対する発現上にコード付けするDNA配列から成る群から選
択される請求項1記載のDNA配列。

6. 請求項1-5のDNA配列から成る群から選
択されるDNA配列を含む組換えDNA分子であり、前記DNA配列はT
DNA分子中の発現制御配列に作用的に結合されてい
る分子。

7. 前記発現制御配列が、SV40又はアデノ
の初期又は後期プロモーター、lacシステム、lucシ
ステム、lacシステム、lacシステム、lacシステムの主要オペ
レーター領域、10kbpタンパク質の制御領域、
グリセリン酸キナーゼ又は他のグルコース分解酵素
プロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター及
トC-交配因子のプロモーターから成る群から選択
される請求項1記載の組換えDNA分子。

8. 分子が、pLFA31701、908、pLFA31710、
及びpLFA31725から成る群から選択される請求項1記
載のDNA分子。

9. 請求項6, 7又は8の組換えDNA分子から成
る又は組換えDNA分子により形質転換された中細胞;

12. 請求項1-5のDNA配列から成る群から選択されたDNA配列により発現上にコード付けされたポリペプチドであり、前記ポリペプチドはヒト組織の他のタンパク質が本質的に無いポリペプチド。

13. 前記ポリペプチドが、第1図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第2図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第3図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第4図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第5図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第6図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、及び第7図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチドから成る群から選択される請求項12記載のポリペプチド。

14. 請求項8記載の単細胞培養を培養する段階を含むポリペプチドの製造方法。

15. 形質転換した宿主が、CHO(BG8)、R1.1(BG6)、L-8(1Y)(BG8)、大腸菌JA221(pLP38:col)、CHO(pLP38M16)、CHO(pLP38M17)及びCHO(pLP38M18)から成る群から選択される請求項14記載の方法。

16. 請求項12又は13のポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの免疫抑制又は促進に有効量と薬学的に受け入れ可能な担体とを含む医薬品組成物。

17. 請求項18の組成物から成る群から選択された組成物により細胞学的に受け入れ可能な方法で患者を治療する段階を含む患者を治療する方法。

18. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、請求項12又は13のポリペプチド又はこれらポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの効果を含有過剰な又は過剰されたT-細胞により特定の疾患の過程をモニターする診断組成物。

19. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、請求項13の組成物から成る群から選択された組成物として使用する段階を含む過剰な又は過剰されたT-細胞を特徴づけられる疾患の過程をモニターする方法。

20. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、又は請求項18の組成物から成る群から選択された組成物を含む過剰な又は過剰されたT-細胞により特徴づけられる過程をモニターする方法。

要約

DNA配列、組換えDNA分子及びリンパ球機能-含有した抗原-3の製造方法

本発明は、DNA配列、組換えDNA及びリンパ球機能の含有した抗原-3(LFA-3)の製造方法に関するものである。更に特別には、本発明は、DNA配列が、CD2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合したLFA-3又はその誘導体に類似して、適切な単細胞培養室中の発現にコード付けすることを特徴とするDNA配列に関するものである。更に好適には、本発明のLFA-3及びその誘導体はT-リンパ球の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リンパ球と標的細胞との間の粘着を防止する。本発明によると、これらのDNA配列で変換された単細胞培養室とこれらを含む組換えDNA分子は、ヒト組織の他のタンパク質が本質的に無いLFA-3を製造するのに使用されて良い。それ故にこの新規な抗原は、治療と診断の組成物において及びこの発明の方法において使用されて良い。

本発明の背景

T-リンパ球は、標的細胞及び抗原提示細胞と相互作用

T-リンパ球の標的及び抗原-提示細胞との相互作用は、高度に特異的であって、かつ標的又は示細胞上の抗原は、T-リンパ球の表面上の多くの特異的レセプターによる認識に左右される。

T-リンパ球と他の細胞のレセプター-抗原相互作用はまた、各種のT-リンパ球表面タンパク、例えば、チヌー複合体のCD3(72)と補助分子のCD4、LFA-1、CD8により促進される。それはまた、標的又は抗原-提示細胞に発現されるLFA-3、ICAM-1及びMHCのような抗原に左右される。事実、T-リンパ球上の及び標的又は示細胞上の補助分子は、相互作用して細胞間の粘着と促進されている。従って、これらの補助分子は、抗原-抗原-提示細胞とリンパ球-標的細胞との相互作用、かつ白血球-内皮細胞相互作用とリンパ球-抗原-提示細胞との相互作用と関係している。

例えば、最近の研究は、CD2(T-リンパ球補助分子)とT-リンパ球の標的細胞への粘着を促進するLFA-3(標的細胞補助分子)の間の特異的相互作用があることを提案し、この粘着は、T-リンパ球の機能化等の開始に本質的である。M.L.ダステン等、「CD2に結合した複製したリンパ球-含有した抗原-3及びT-リンパ球細胞の相互作用」

T-リンパ球-媒介された細胞溶解と抗原会合した3つの異なる抗原: LFA-1, LFA-2, 及び LFA-3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (「プロシーディング ナショナル アカデミー サイエンス、米国」), 第79巻、第7(1982-32頁 (1982))。

LFA-3は、抗原-提示細胞、及び樹状細胞、特に単核、顆粒球、CTL細胞、B-リンパ球、T-リンパ球、平滑筋細胞、血管内皮細胞、及び繊維芽細胞に見いだされる(スプリンゲル等、上記文献)。

ヒトLFA-3は、ヒト赤血球から精製されている(ダステン等、上記文献)。これは、概含有量約50%の分子量60,000-70,000の糖タンパク質である。この糖質LFA-3は、T-リンパ球の表面のCD2へ結合しており、かつT-リンパ球と赤血球の粘着を防止する(ダステン等、上記文献)。

しかし、治療と診断における基本的使用に対して、多量のより安価なLFA-3が、赤血球からの精製で入手されるものよりも希望されている。更に、治療の使用に対して、B型肝炎ウイルス又はエイズウイルスのようなウイルスで汚染されているかもしれないヒト赤血球と異なる他の原料からのLFA-3を得ることがより好ましいであろう。

発明の概要

本発明は、これらの問題を解決する。本発明は、CD2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合するLFA-3とその誘導体を多量に提供する。更に好適には、本発明のLFA-3及びその誘導体は、T-リンパ球の表面のCD2へ結合しており、かつこれらはまた、T-リンパ球と赤血球の間の粘着を防止する。更に特別には、本発明は、可溶性形態のLFA-3に關

するものである。本発明はまた、ヒト起源の他のクの本質的に無かつエイズ又はB型肝炎のようなウイルスより汚染されていない形態のLFA-3を提供する。

本発明は、これらの目的を、適切な単細胞発現にLFA-3又はこれらの誘導体に対してコード付の配列を提供することにより達成するものである。更明は、可溶性形態のLFA-3に対する発現にコード付のとを特徴とするDNA配列を提供するものである。

本発明はまた、これらのDNA配列とこれらで得られた単細胞宿主を含む組換えDNA分子を誘導するもの。これらの宿主は、広範囲の各種治療及び診断の場面に使用するための本発明の新規なLFA-3と誘導体を製造することを可能とする。

本発明のDNA配列は:

- (a) DNA配列: フォージ入5'1Gに結合される断片;
- (b) 前記DNA配列に対して7a以下の約20-271の条件下にハイブリッド形成され、かつT-リンパ球の表面のレセプターへ結合するリペプチドに対して発現にコード付けられた配列; 及び
- (c) 前記DNA配列のいずれかにより発現に対してコード付けされたポリペプチドに対してコード付けするDNA配列

から成る群から選択される。

図面の簡単な説明

第1図は、H-末端のアミノ酸配列と、免疫親和性クロマトグラフィーを使用してヒト赤血球から精製したヒトLFA-3の各種ペプチド断片を示している。

第2図は、ヒト赤血球から精製したヒトLFA-3のアミノ酸配列から誘導した化学的に合成したオリゴヌクレオチドDNAの2つのプールを示している。

第3図は、フォージ入5'1Gに結合されるDNA挿入断片のDNA配列を示している。第4図はまた、ヒトLFA-3とこれから推定されるアミノ酸配列に対して発現にコード付けするCD2のヌクレオチド配列を示している。

第5図は、配列決定のプラスミドpEV01C関係部分を示している。

第6図は、プローブLFA-10, LFA-11, HA-3, HA-2, HA-C, 及びHA-Dを示している。

発明の詳細な説明

発明者等は、2つのライブラリーから本発明のDNA配列を単離した: 白血球泳動法からの末梢血液リンパ球から誘導したλgt10 cDNAライブラリーとヒト扁桃から誘導したλgt10 cDNAライブラリーである。しかし、発明者等は、

これらのライブラリーをスクリーニングする発明者等は、一連の化学的に合成した非転写オリゴヌクレオチドプローブを使用した。発明者等は、発明者: 赤血球から精製したLFA-3を使用して決定したLFA-3断片のアミノ酸配列を考慮してこれらのプローブを通これらの断片は、第1図に示している。発明者等は、量のオリゴヌクレオチドプローブの誘導を可能にする各種領域からアミノ酸を選択した。

発明者等は、プローブの2つのプール: 1) を調製した。これらのプールを第2図に示している32-ホールド箱置16-マーであり、かつLFA-3は、38-ド箱置20-マーである。この後者のプールの高いに、発明者等は、プールを各々が38-ホールド箱置のプール - LFA-3, LFA-2, LFA-1及びLFA-4に細別した。

スクリーニングする為、発明者等は、ハイブリッド形成スクリーニング検査を利用する発明者: cDNAライブラリーに対して、発明者等のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリッド形成した。発明者等は、発明者等のプローブに対してハイブリッド形成するク選択した。更に、選択したクローンのcDNA挿入断片かつプラスミド中にサブクローン化した後に、発明者

決定した。

発明者等は、これらのcDNAの最長のヌクレオチド配列(フージムHT16のcDNA挿入断片)とLFA-3とそれから推定されるアミノ酸配列に対してコード付けするDNA配列を第3図に表現している。第3図に示すように、このcDNA挿入断片は、750bpの塩基配列(250アミノ酸)、16bpの翻訳しない領域及び201bpの翻訳しない領域を有する。発明者等がヒト赤血球から精製したLFA-3から決定したN-末端アミノ酸配列を有する第3図の推定アミノ酸配列の比較は、アミノ酸-21〜1は、信号配列から成り、かつアミノ酸1〜222は成熟LFA-3のタンパク質配列から成ることを暗示している。

第3図に示されかつ預けたクローニングHT16に含まれるcDNA配列は、本発明に従って多種方法で使用される。これは、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーは、DNAプローブとして使用して、他のヒトのcDNA又は動物のcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングして良く、このゲノムライブラリーは、LFA-3に関する他のcDNA配列を、ハイブリッド形成により選択するためのものである。代表的に、普通のハイブリッド形成条件、例えば、 50°C 以下約 $50\sim 25^{\circ}\text{C}$ が、このような選択に適用される。しかし、より少ない塩濃度条件は、ライブラリーがライブラリーと異なる種からのプローブでスクリーニングされる場合に、例えば、ヒトプローブでマウスライブラリーのスクリーニングする場合必要である。

第3図のcDNA、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーはまた、各種変異を誘発する出発材料として使用される。このような変異は、どちらかの位置であって良く、即ち、変異は、変異コドン又は非変異によりこれに対して暗

号化されるアミノ酸配列を変えず、即ち、変異は、コドンによりこれに対して暗号化されるアミノ酸配列。例えば、これらの変異は、より容易な複製又はLFA-3活性のような、より高いレベルの製造を可能。

これらの点の理由に対して、本発明のDNA

(a) DNA配列：フージムHT16に組込まれる断片；

(b) 前記DNA配列に対して T_0 以下の約 $50\sim 25^{\circ}\text{C}$ の条件下にハイブリッド形成され、かつ5'-リンパ基の表面のレセプターへ結合し、リベプチドに対して発現にコード付けされ、及び

(c) 前記DNA配列のいずれかにより発現に対してコード付けされたポリペプチドに対してコード付けするDNA配列

から成る群から選択される。

好適には、本発明のDNA配列は、第3図の1〜222(追加2-末端メチオニンを含む又は有しないこれらの一部に対して示される配列を有するポリペプチドにコード付けする。更に好適には、本発明のDNA配列は、より小さいタンパク質の製造を可能にする為、成トランスメンブラン部分に対してコード付けする部分を、それから、例えば、約682-715ヌクレオチドを有する、第3図のもの(アミノ酸1-222)に比較されるだろう。最も好適には、本発明のDNA配列は、タンパク質又はCD2に結合するペプチド、T-リンパ球のレセプターに対してコード付けする。更に好適に

明のLFA-3と誘導体は、T-リンパ球の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リンパ球と他の細胞との結合を防止する。

本発明のDNA配列はまた、LFA-3又はこの誘導体の製造に有用であり、これらは、これらにより、これらのDNA配列で変換される細胞組織において、発現にコード付けされる。この分野で周知のように、本発明のDNA配列の発現に対して、DNA配列は、適切な発現ベクターにおいて発現制御配列に作動的に結合され、かつ適切な細胞組織に変換する為、この発現ベクター中に利用されるべきである。

本発明のDNA配列の発現制御配列に対するこのような作用的特性は、DNA配列の上流の正しい塩基配列における翻訳開始符号の提供を含む。若し発現されるべき本発明の特別なDNA配列が、例えば、フェニルアラニンで開始する成熟LFA-3のようにメチオニンで開始されないならば、開始符号は別のアミノ酸において起こる--メチオニン--生成物のN-末端に位置される。一方、このようなメチオニン-含有生成物は、本発明の組成物と方法に適用に利用されて良く、使用する前にメチオニンを除去するのが一般的により望ましい。このようなN-末端メチオニンをメチオニンで変換されるポリペプチドから除去する方法は、技術分野において提

高範囲の各種宿主/発現ベクター組合は、このDNA配列を発現するのに利用される。有用な例としては、例えば、染色体の、非染色体の及び合成のDNA配列から成り、このようなDNA配列は、SV40の各種誘導体、知細胞プラスミド、例えば、coi 21、pCR1、pSR322及びこれらの誘導体を含む大腸菌からのプラスミド、宿主領域プラスミド、例えば、REP、フージムDNA、フージムの多くの誘導体、例えば、BM989、及び他フージム、例えば、Y13及び繊維状一本鎖DNAフェーラスミド又はその誘導体のような酵母プラスミド、フージムDNA又は他の発現制御配列を利用する為、またプラスミドのようなフェーラスミドである。動物細胞に対して、発明者等は、好んでプラスミドpG218、アタリス2の主要プロモーターを含むプラスミドを使用

更に、どの高範囲の各種発現制御配列--CD、作用的に結合する時にこのDNA配列の発現を制御するこれは本発明のDNA配列を発現する為、これらのペ使用して良く。このような有用な発現制御配列は、SV40又はアデノウイルスの初期と後期のプロモーターシステム、*luc*システム、*lac*又はIREシステム、フェーラスベクター及びプロモーター領域、*ld*コート

は、好んでアデノウイルス2の主後期のプロモーターから誘導した発現制御配列を使用する。

両細胞の各種細胞宿主細胞も、本発明のDNA配列を発現するのに有用である。これらの宿主は、大腸菌、シェードモナス、バシラス、ストレプトミセスの菌株、イーストのような菌類、及びCHO及びマウス細胞のような動物細胞、COS1、COS7、BSC1、BSC40及び293T10のようなアフリカマドリサル細胞、及びヒト細胞及び組織培養の動物細胞のような周知の原核細胞と真核細胞宿主を包含する。動物細胞発現に対して、発現宿主はマウス細胞を好む。

勿論、総てのベクター及び発現制御配列が、本発明のDNA配列を発現するのに充分に巧しく作用するとは限らないことを理解すべきである。また総ての宿主も、同じ発現システムで充分に巧しく作用しないであろう。しかし、当業者は、不適切な実験をすることも無く、かつ本発明の範囲から離脱すること無く、これらベクター、発現制御配列及び宿主の間で選択をすることが出来る。例えば、ベクターを選択する際に、宿主は、ベクターがその中に複製しなければならないことを考慮されなければならない。ベクターのコピー番号、このコピー番号を制御する能力、及び抗原性マーカーのようないベクターにより暗号化されるなどの他のタンパク質もまた考慮されなければならない。

発現制御配列を選択する際に、各種の因子もまた考慮されなければならない。これらは、例えば、システムの相対的速さ、その制御受け品さ、及び本発明の、特に電位二次構造に関して特別なDNA配列との適合性を含む。細胞宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対して本発明の

ペプチドは、癌細胞とのこれらの相互作用を妨げることにより細胞溶解T-リンパ球活性を防止するのに悪性である。これらは、ヘルパーT-細胞と抗原-提示細胞の相互作用を妨げる為に、免疫応答に対して同じ効果を持つ。更に、本発明の化合物は、癌細胞と免疫抑制の癌の標的細胞に、又はリンホカインのような分化薬に、特異的に標的とするT-細胞に使用して良い。更に好適には、本発明のポリペプチドの可溶性誘導体は、T-リンパ球のCD3受容体を飽和するのに利用して良く、かくしてT-細胞活性化を防止する。この効果は、移植片対宿主疾患において、自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチにおいて、及び同種異系移植拒絶反応の防止において明白に大きな有用性がある。更に、本発明のポリペプチドは、これが、ヒト以外の種に起こる抗体であるよりも、ヒトにおける免疫応答を惹起しようも無い為に、LFA-3又はCD3に対するモノクローナル抗体以上に好まれる。本発明の脂質組成物は、このようなポリペプチドの免疫抑制又は促進に有効性、及び薬学的に受け入れ可能な薬物から代表的に成る。本発明の治療方法は、これらの組成物により薬学的に受け入れ可能な方法において患者を治療する段階から成る。

これらの治療に使用する為の本発明の組成物は、各種形態を取る。これらは、例えば、錠剤、丸剤、粉末、液体

DNA配列により発現にコードされた組成物の毒性、組成物性、タンパク質を正確に折り畳む宿主の能力、誘発性、及び本発明のDNA配列により発現にコードされた組成物の暗号の容易さを考慮することにより選択されなければならない。

これらのパラメーター内で、当業者は、発現又は大規模の動物細胞、例えば、マウス細胞培養で、本発明のDNA配列を発現するであろう各種ベクター/宿主の組合せを選択して良い。

本発明のDNA配列の発現により製造されたペプチドは、発酵又は動物細胞培養から単離され、かつ分野で周知の各種方法で精製されて良い。このよう精製された、各種因子、生体物がいかにして製造されそれが可溶性か不溶性かどうか、及びそれが標的されるか又は細胞を破壊することにより単離されいかどうかのような因子に左右される。しかし、当本発明の範囲から離脱することなく、適切な単離とを選択して良い。

本発明のDNA配列、例えば、*mol-LFA-3* (第1図の酸1-222)又は*LFA-3* (第8図の*アミノ酸*1-222)、好適なより小さく疎水性でない誘導体、又は更に好ましい可溶性誘導体の発現により製造されるポリペプチド本質的にヒト細胞の他のタンパク質を含まず、かつウイルスとエイズウイルスのようなウイルスによりでない。

これらのポリペプチドは、免疫応答を遮断大する組成物と方法に有用である。例えば、本発明

一回又はそれ以上、患者に投与されるだろう。

一般的に、本発明の脂質的組成物は、他の脂質性ポリペプチド (例えば、 α -インターフェロン) で使用されるものと同じ方法と組成物を使用して与えられて良い。従って、ポリペプチドは、凍結で貯蔵され、投与前に殺菌水で戻し、かつ希釈し下、静脈内又は経腸内の経路のような普通の方法で投与される。

本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体、診断組成物と方法にも有用であって、T-細胞又はCD3細胞を抽出し、又は自己免疫疾患、移植片対宿主及び同種異系移植拒絶のような過剰又は抑制T-細胞とする免疫の過程をモニターする。

最後に、本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体は、B及びT細胞を分離するのに有用である。抗体抗体に結合する時に、本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体は、BとT細胞を分離するだろう。

本発明がより良く理解される為に、次の図を参照する。これらの実施例は、説明の目的のものとして提供される方法においても、本発明の範囲のものとして解釈されるべきでない。

セツから入手)からトリプシン断片を生成し、かつ表1面に示される部分アミノ酸配列を決定するのに利用した。

発明者等は、(Kb.)₂SO₄沈殿によるハイブリドーマ培養とタンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーとによるハイブリドーマ培養上清からモノクローナル抗体(MAb) F52/11(サンチエズ-マドリッド等、前記)を精製した。次いで発明者等は、この精製MAbを使用して次の精製に使用する為の親和性カラムを調製した。

発明者等は、カトナカイスの方法[マーチ等、Anal. Biochem. (アナリティカル バイオケミストリー) 第66巻、第149頁(1974)]の方法の改良によりセファロースCL-4Bに対して精製MAbを結合した。発明者等は、夜存セファロースCL-4B(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン)を100g、CO₂中の40mg/ml CNBrで氷上10分間活性化し、次いでそれを蒸留水と0.1M HClで洗浄した。発明者等は、活性化セファロースを濾過して得たケーキとし、次いでそれを0.05M NaClと0.1M NaHCO₃(pH8.4)中の2-tag/ml IgG(LFA-3 MAb又はマウス IgG)と共に洗浄抗体溶液へ添加した。次いで発明者等は、この分散体を回転しながら30時間混合し、次いでエタノールアミン50mMの添加と1時間の静置により吸着反応性を封鎖した。発明者等は、280nmにおいて吸光度を測定することにより吸着抗体に対して上清を検査した。結合は普通98%のオーダーであった。次いで発明者等は、カラム中にMAb-結合セファロースを詰め、次いで親和クロマトグラフィーに対して使用する前に、それを1サイクルのpH11とpH2緩衝液(下記参照)で洗浄した。

発明者等は、LFA-3を溶出する為にオクテル-β-D-グルコピラノサイド(OG)(カルピオケミー)を使用した時に、総ての段階は、高pH洗浄の後まで同じであった。この時点で、発明者等は、カラムを5倍量の磷酸緩衝液(pH7.2)、1% OGを含む0.15M NaCl、で洗浄し、次いでグリシン緩衝液(pH8)、0.15M NaCl、1%OGを使用してLFA-3を溶出した。溶出プロフィールは、トリトンX-100で得たものと同じであった。発明者等は、続いてこのLFA-3を¹²⁵I-LFA-3 MAbで「ドット・プロット」検定法[ハクセス等、Anal. Biochem. (アナリティカル バイオケミストリー) 第119巻、第142頁、(1982)]を使用して半定量的方法で測定した。

トリプシン消化とアミノ酸配列決定に対して精製LFA-3を調製する為に、発明者等は、N-グリコシダーゼFを調製して、供給者(ゲンザイム、ボストン マサチューセツ)の指示に従って、僅かに改良した方法で脱グリコシレートした。先ず発明者等は、エタノール沈殿(トリトンX-100)又は超遠心分離(OG)によりデタージェントからLFA-3を分離した。次いで発明者等は、LFA-3を25μlの0.5%SDS、0.1M 2-メルカプトエタノールと共に5分間沸騰することにより溶出した。次いで発明者等は、酸性LFA-3を、最終濃度50μg/lにおいて、1%トリトンX-100と10mMの1,10-ブエナントレオンを含む50mM

発明者等は、前記の親和クロマトグラフィー等、前記)によりトリトンX-100で可溶化した後L洗した。発明者等は、総ての段階を4℃で実施した。

発明者等は、応用期間を過ぎたヒト赤血球赤十字(ニーダマン、マサチューセツ)から得た等は、1ユニットの全血液からの細胞をPBS(pH7.2)で洗った。次いで発明者等は、充満細胞を約500mlとし、次いで撹拌しながら赤血球を1%トリトンX-1ニールメチルスルホニルフロライド、5mM コードアト及び0.1%トリプシン阻害剤ユニット/ml(アプログ)加した。1時間後、発明者等は、懸液物を150,000g心分離した。次いで発明者等は、透明液を流し、2つのカラムに順々に送った。(1) 流しかの不均質かつどの粒状物も通過する為にマウス IgG-セファローム(20g/mlで2x1)、及び(2) LFA-3 MAb-セファローム(20g/mlで5-10ml)。発明者等は、LFA-3 MAb-セファロームを、3カラム容量の50mM磷酸ナトリウム(pH0.25M NaCl、0.1%トリトンX-100、次いで5カラム容トリニナルアミン(pH11)、0.25M NaCl、0.1%トリト及び再び2カラム容量のpH7.2の緩衝液で、捨て1速で洗浄した。次いで発明者等は、懸液LFA-3を5カラムの50mMグリシンHCl(pH3)、0.25M NaCl、0.1%トリトで20ml/80間の流速にて溶出した。発明者等は、溶出液を1%トリトンX-100(pH8.4)、0.1%トリトンX-100中に集めより中和した。

発明者等は、調製用SDS-PAGEと電気泳動でLFA-3(25Kd)を処理して高度に精製したN-グルカナ製した。発明者等は、アルゴン下100℃で3分間、N-アセ-処理LFA-3(約350g/mol)を250mMのN-エタノールアセテート中の5mMUBT、1mMSDTA、0.2%SDS(pH8.25)し、次いでそれを貯所で22℃にて30分間、11mMコトリウムでアルキル化した。発明者等は、生成物(-3)を、0.3%SDS、250mM N-エタノールアセテート(pH8.25)で平衡させたセファダックスC-25でゲル3ことにより純化し、それを凍結乾燥した。次いで乾燥、凍結乾燥したLFA-3を10mlの黒水エタノール、-20℃で1日間貯蔵し、LFA-3を4℃で30分間60遠心分離することにより戻した。発明者等は、沈殿物の0.1%NaHCO₃中に溶解し、次いでそれをベビンJBC(ジャーナル バイオロジカル ケミストリー)第24235頁、(1986)に記載のようにしてTPCK-トリプシンで消化した。発明者等は、消化物を凍結乾燥まで酸性とし、直ぐに狭い口径C₁₈カラム(アグアポ-0.6, 21x10cm、ブワウソリー フラップス)で逆相HPLCマトグラフィーにより断片を分離した。発明者等は、たペプチドを、流速0.3ml/分(0.5分の分画を収収)で

479A ガス相レークセンサを使用する自動エドマン分解[ヘビクタ等、18C、(グーグル バイオロジカル ケミストリー) 第18巻、第1896頁、(1981)]に付した。発明者等は、アブライド バイオシステムズ 180A PTH 分析機を使用するオンラインでPTH-アミノ酸を測定した。相違タンパク質の配列決定は、第1図に示すように38位のアミノ酸の配列を与えた。

オリゴヌクレオチド プローブの合成

発明者等は、最少核酸塩量により特徴づけられるLP1-3のアミノ酸末配列(第1図の下線部参照)からの領域に対してコード付けする逆転写オリゴヌクレオチドRNAプローブの2つのブールを、アブライド バイオシステムズ 20A 45A 合成機により化学的に合成した。各々の選択したアミノ酸配列に対して、発明者等は、総ての可能なコドンへ相補のプローブのブールを合成した。発明者等は、cDNAのみならずDNAの対応配列へこれらのハイブリッド形成を可能にする非転写プローブを合成した。発明者等は、(γ-³²P)-ATPとオリゴヌクレオチド カナーゼ[マックスマとギルバート、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (プロシーディングス ナショナル アカデミー サイエンス) 第74巻、第550頁(1977)]を使用して発明者等のオリゴヌクレオチドプローブに標識した。

第2図に示すように、オリゴヌクレオチドブールLF1は、32-ホールド塩量を持つ39-マーであった。ブールブールLP2-5は、384-ホールド塩量を持つ20-マーであった。しかし、その塩量を縮小する為、発明者等は、G1yに対する縮小したコドンを含むサブブールに対してその4つの可能なヌクレオチドの一つに附接することにより、95-ホ-

ールド塩量の6個のサブブールの各々の中にこのブールした。次に発明者等は、取説したように、ヒト肝臓有するノーゼン プロット法に対して [クオルナー *Nature* (ネイチャー)、第326巻、第77-81頁(1986)]、ブールのハイブリッド形成により、不正確な配列3個のブールから正確な配列を含むサブブールを選ヒト毎個55A中の186ヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドプローブサブブール正確な配列を含んだことを暗示した。従って、発明者等の各電ライブラリーをスクリーニングすればとブールLF1を使用した。

2.118塩量のポリリンベリ cDNAライブラリーの標識

発明者等の末梢血単リンベリ(PBL) cDNAライブラリーを調製する為、発明者等は、単球を除去する一選介して白血球移動器によりPBLを操作した。次いで、非粘着細胞を10⁶個/1000U/mlと10⁶g/ml PMAで2標した。発明者等は、フェノール抽出を使用して細胞からRNAを抽出し[マニアチス等、*分子クローン* 187頁(コールド スプリング ハーバー ラボラトリ、次いで一選のオリゴdTセルローズ クロマトグラフ、ワポリ *Nature* を調製した。発明者等は、このRNAをホル沈降し、それを高純度真空乾燥し、次いでこのRNAをH₂O(0.5 \pm 6/ μ C)中に再分散した。発明者等は、CH₂最終濃度)及び β -メルカプトエタノール(0.5 μ g/ μ l)塩にて10分間処理した。次いで発明者等は、メチルしたRNAを、42°Cで0.1Mトリス-HCl(pH8.3)、0.01M

バナジル硫酸塩、5 μ MオリゴdT、20mM KCl、1 \times MDT、dGTP、dTTP、0.5mM dATP、20mM KCl、1 \times MDT、dGTP、dTTP、0.5mM dATP、総容量50 μ l中の2 μ C[α -³²P]dATP及び30U、5 μ M AMV 逆転写酵素(セイカダク アメリカ)へ添加した。発明者等は、混合物を3分間室温にて、次いで5時間44°Cにて培養し、次いで0.5M EDTAの1.5 μ Eを添加することにより反応を停止させた。

発明者等は、反応混合物を等容量のフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、水相層を0.1容量の10% SDSと2.5容量のEtOHで2回沈降させ、次いで真空下に乾燥した。cDNAの収量は1.5 μ gであった。

発明者等は、合成中にDNAポリメラーゼI大型断片を使用した以外は、オカヤマとベルグ[*Nat. Cell. Biol.* (モレキュラ セルラー バイオロジカル) 第2巻、第161頁、(1982)]及びグブラーとホフマン(遺伝子、第25巻、第283頁、(1983))の方法に従って第2鎖を合成した。

発明者等は、80 \times 4T1細胞株[6.033Mトリスアセテート(pH7.8): 9.066M酢酸カリ: 0.01M酢酸マグネシウム: 0.001M DTI: 50 μ g/ml BSA)、5 μ g/ml ナーゼA、1ユニットのクラーゼII、50 μ g/ml K₂S₂O₈、2ユニットのクラーゼIIリガーゼ、0.3155mM dATP、dGTP、dCTP、0.05M dTTP、10 μ g/ml のポリメラーゼ

れをエタノール沈降させた。収量: 805 μ g cDNA。

発明者等は、標準法を使用して、二本鎖シナカー-23/35に結合した。

5'-AGTTCGAGCTCCGCGCGGCCG3'

3'-GCTCGAGCTCCGCGCGGCCG5'

次いで発明者等は、5500 セフアクリル カラムで20 cDNAとより長い断片に大きく分別し、それをECORII λ gt10に結合した。発明者等は、製造者の協定付随でオガバク(許諾遺伝子)中に結合反応物の一定量を発明者等は、充填ファージを使用して、*大腸菌* BHI1 感染させ、次いで増殖の為に細胞を塗布した。得るブラリーは、1.183 \times 10⁶の独立相換え株を含んでい

ライブラリーのスクリーニング

発明者等は、ヒト肝臓 λ gt10 cDNAライブラリー等、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (プロシーディングス ナショナル アカデミー サイエンス)、第82巻、第7711-7715)、及びベントンとディビス[*Science* (サイエンス) 第180巻、(1977)]のブランク ハイブリッド形成ンニング技術を使用して、上記調製したPBL cDNAライブラリーをスクリーニングした。

37℃で8時間培養した後、発明者等は、プレートからフィルターを引き上げ、これらを0.5M NaOH/1.5% SDSのブールに5分間置くことにより溶解し、次いでこれらと同じ緩衝液中に5分間浸漬した。発明者等は、これらを0.5M トリス-HCl (pH 7.4)、1.5% SDS中に、5分間づつ8回浸漬することによりフィルターを中和し、これらを1% SDS中に2分間洗浄し、次いでフィルターを乾燥し、次にこれらを80℃で2時間ベークした。

発明者等は、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコル (MW400,000)、0.2%牛血清アルブミン、0.05%トリス-HCl (pH 7.5)、1M塩化ナトリウム、0.2%ピロリン酸ナトリウム、1% SDS、10%硫酸デキストラン (MW500,000)及び100 µg/ml PPA中で、オリゴヌクレオチドプローブLP1に対してフィルターに予備ハイブリッド形成及びハイブリッド形成した。発明者等は、オートラジオグラフィによりハイブリッド形成するλ-cDNA配列を検出した。

発明者等は、PBLライブラリーから12正ファージをかつ筛选ライブラリーから12正ファージを始めに選択した。次いで発明者等は、これらのクローンと、同じプローブを使用して低い密度でこれらを複製したプローブを再スクリーンした。

発明者等は、このクローンから単離したDNAをEcoRIで消化し、次いでこれらをサブクローン技術 (E.Y. サブク、J. Mol. Biol. (ジャーナル モレキュラー バイオロジー) 第88巻、第338-348頁 (1975)) を使用してオリゴマー プローブLP1及びLP2に対してこれらにハイブリッド形成した。次いで発明者等は、更に筛选ライブラリーの2つのクローン

を使用した。pHKO1の構成は、NciI消化と4つの20-ヌクレオチド長プローブ: PH-A, PH-B, PH-C, 及びPH-Dを使用する挿入した断片の位置の配列決定をチャーチ-ギルバート研究法により可能にする。第5図参照のこと。

2つの重要な配列決定の結果が、チャーチ-ギルバート方法により発明者等のサブクローンからえられた。一つの実験において、発明者等は、224bp EcoRI断片を結合するEcoRI部位を超えて配列を決定する為、LP19とLP11(第5図)に関係無くλHT16からPvuII消化DNAを証明した。このことは、このファージの2つのEcoRIサブクローン (pHT16HとpHT16L) の分析は、小さいEcoRI断片への5'又は2つのEcoRI断片の間の5'のいずれかの配列を見落としていた可視性を積極的に反証した。発明者等はまた、このEcoRI部位を正確に有するHclIサブクローン形成したpP20の分析によりこの結果を確認した。発明者等はまた、PvuIIでpP20を消化し、かつハイブリッド形成プローブとしてLP10(第5図)を使用するチャーチ-ギルバート方法により断片の配列を決定した。このことは、挿入断片の5'末端はλHT16の5'末端と全く同じであったことを証明した。

第3図は、ファージλHT16のcDNA挿入断片のDNA配列を示している。これはまた、LPA-Bに対してコード付けす

(λHT16とλHT19)からのDNAとPBLライブラリーからクローン(λP26とλP24)からのDNAをDNA配列決定法に従って調べた。

cDNAクローンの配列決定

発明者等は、配列分析を促進する為、λHT16とλP26からのEcoRI消化したDNAを、pB801でクローン化した。λHT16は、2 EcoRI断片を有して発明者等は、プラスミドpHT16HとpHT16Lに結合するpB801断片をサブクローン化した。λP24の総ての挿入断片EcoRI断片上に含まれている。サブクローン化の発明者等は、普通に使用される技術を使用してベクター部位又はSmaI部位を使用した。

発明者等は、制限消化により合成ポリリンを除去し、かつそれを新しい合成断片で置換することにより配列決定プラスミドpB801を構成した。pB801プラスミドは、5'末端に、複製開始点を付与し、かつアンピシリン耐性をもつものであるが、変化した。pB801の合成部分は第4図に示されている。

発明者等は、マックスムとギルバートの方法 (Sequenase, (酵素学方法) 1980) により発明者等のクローンのDNA配列を大部分決定した。しかし、後述の如くして、発明者等は、チャーチとギルバートの関連 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー サイエンス 米国) 第87巻、第1991

cDNA断片中にLPA-3 HT16 cDNAの発現

下記p24HT16LFA882の960bp EcoRI-MaeI断片発現ベクターを与える為、B8012発現ベクターのSmaI中に挿入する。ベクターB8012は、インビトロインクナルカルチャーコレクション、C11P、ハモンドスーパード、ランタム、マリーランド、1990年5月24日で預けられており、かつ受け入れ番号1Y1-J0110でされている。B8012(テイター、Cell (細胞)、第65巻、第980) において、挿入断片DNA配列の発現は、アデノ2480プロモーターの制御下にある。p24HT16LFA882は、の800bpEcoRI断片をプラスミド部分を含むp24の大型断片と結合することにより形成された。p24のEcoRI断片配列は、第9図の塩基対1-223のDNA配列に一致する。HT16-CNO細胞系を樹立する為、発明者等は、1x10⁶ (2BPR)細胞 [カジンとカルバン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシーディングス ナショナル アカデミー サイエンス) 77巻、第4816頁 (1980)] を、180 µgのXenI消化したB8012のSmaI消化したp24 DNA [カウフマンとシャープ Cell, Biol. (モレキュラー セル バイオロジー)、第1304頁 (1982)]、及び350 µg PDに設定したキャパシタ0.200Vにてピオラド (リッチモンド、カルフォルニア)

MEMブラス200nm、400nm又は800nmメトリセートのいずれか中にて成長させた。コロニーは、200nmメトリセート中で最も良く成長し、このコロニーから、発明者等は、何々のコロニーを単離し、蛍光活性化細胞ソーター(FACS)(ベクトン・ダイキン・マウンティンビュー、カルホルニア)で間接的免疫蛍光の強度を測定することによりLFA-3の発現に対して、かつ下記のようにロゼティング(細胞粘着)に対して検定する為に、100mmプレート当たり 1×10^5 細胞までこれらを成長させた。

FACSにより分析する為に、各BT16-CROメトリセートクローン当たり 1×10^5 細胞と制御CHO細胞は、4℃で15分間、ヘンクのSSS(スベルアクト)緩衝液、0.5% BSAと共に培養することにより、組織培養皿から除去された。次に分離した細胞は、ペレットとされ、50μlのPBS緩衝液(1xPBS、0.3% BSA、0.1%ナトリウムマジド)中に再分散し、45分間氷上で100μlモノクローナル抗体TS2/9(1.2μg/μl)(チム・スプリングルの贈り物)で培養した。次に発明者等は、10μlのPBS緩衝液で2回細胞を洗浄し、遠心分離器でペレットとした。この細胞ペレットを、PBS中の1:50希釈PC1(蛍光共役細胞精製F(ab')₂断片ヒッジ・アンナマウス [αβ(αβ、βイオケミカル、ペンシルバニア)]の100μl中に再分散し、次いで30分間氷上で培養した。細胞を遠心分離器でペレットとし、遠心のPBSを細胞ペレットを、1xのPBS(スベルアクト)緩衝液中に2回再分散することにより除去した。次いで発明者等は、細胞を1xPBS800μl中に再分散し、次いでFACSにより蛍光強度を決定した。5つのクローンが、対照CHO細胞とLFA-3発現に關して均一細胞集団よりもより高い蛍光を示した。

除まで希釈することによりクローンを選別した。8つの副産クローンを繁殖させ、前記したようにFACS分析によりLFA-3表面発現に対して検定した。発明者等は、総ての8つのBT16-R1.1クローンが、R1.1細胞より約25倍のレベルでLFA-3を発現したが、しかし総てはLFA-3発現に關して均一細胞集団を示したことを見いだした。

更に発明者等は、FACS上の高い発現度の2つのクローン-R13とR15-を選別した。各々のクローンの1x10⁵ BT16-R1.1細胞を、PBS緩衝液(1xPBS、0.3% BSA、0.1%ナトリウムマジド)中、氷上で45分間、100μl TS2/9 Abで培養した。細胞をペレットとした後に、発明者等は、10μl PBS緩衝液中に再分散することにより、ペレットを2回洗浄し、次いで細胞ペレットを100μlの1:50希釈PC1中に再分散した。氷上に30分間置いた後に、細胞を洗浄し、次いで200μl 1xPBS中に再分散した。BT16-R1.13とR15の選別した均一集団中でLFA-3の表面発現は、JY細胞のものの10%である。

次ぎに発明者等は、R1.1細胞中に発現したようなBT16-cDNAからのLFA-2が、C92 cDNA(L114)(キャサリン・ヘンションの贈り物)を発現する細胞と、かつBT16-CROに対して前記したような同じ方法を使用するジュルカット細胞(チム・スプリングルの贈り物)とロゼット形成を促進する細胞との間の

次ぎに発明者等は、CHO細胞中に発現したLFA-3が、ロゼット形成分析によりCD2発現細胞に結合かどうか試験した。発明者等は、対照CHO細胞と、つまり 2×10^5 細胞の細胞密度で5ウェル組織培養プレート(8cm²ウェル)中でLFA-2(BT16-CHO#30)を発現する細胞を培養させた。プレートを、4℃でソノバル遠心力で2分間(400rpm)で回転した。細胞を2時間4℃で培養細胞をRPMI1660メディアウムで洗浄して過剰のジュルカット細胞を除去した。ジュルカット細胞は、組織培養下に、時に、LFA-3発現のBT16-CHO#30細胞とロゼット形成

発明者等は、BT16-CHO#30中のLFA-2の表面レベルをJYリンパ芽細胞的細胞(チム・スプリングルの贈り物)の発現レベルと、 2.5×10^5 JY細胞、CHO細胞及びBT16細胞を使用して、前記したようにFACS分析を使用し細胞系の相対的蛍光強度を比較することにより比較BT16-CHO細胞は、JY細胞より6倍高い蛍光強度を示した

R1.1細胞中にLFA-3 BT16-cDNAの発現

1.6×10^5 R1.1細胞を、前記したような90μlに溶した発現ベクター-BG8、10μg HseI線状化したプラスミドpCP-DNA[P.グロスベルト等、Genele Acid Reg. (第一)、第16巻、第515頁(1982)]、及び前記したようなクロノレクション(280ボルト、500μF)により300放射線したサケ精子DNAと共に共導入した。RPMI1660 (log/ml G418)中の移入細胞を選択した後に、発明者等は100μl RPMI 1660メディアウム プラス log/ml G418をウェル マイクロタイター プレート中、ウェル当たり

細胞の細胞表面上に発現されることを示した。BT16-細胞又は未移入R1.1細胞は、未移入マウス細胞と異なり成せず、これらの細胞の相互作用の特性性を示すも。

L-細胞中にLFA-3 BT16-cDNAの発現

発明者等は、 1×10^7 (1x)細胞[C.P.タルキJ. Immun. (ジャーナル・イムノロジー)、第181巻、第2(1983)]を、溶記80μg HseI線状化BG8プラスミドDNA BclI線状化pOPFプラスミドDNA(グロスベルト等、上(移入細胞を選択するのに使用出来る)イグン・ホナー・プラスミド)、及び前記エレクトロポレーションによる処置したサケ精子DNA800μgと共に共導入した。細胞は、次いで100mmペトリー皿に移した後に、発明者等は48-72時間、非選択的メディアウム(DMEM)中で培養した。次いで移入された細胞を、100mm当たり 1×10^5 細胞密度で、DMEM+ヒヂンサンテン・アミノプライン・テ(STAT)中で選別した。発明者等は、14日後に13クローするヒヂンサンテンを捨上げ、これらを100mm当たり 1×10^5 で引伸ばし、前記したようにFACS分析LFA-3発現に対して検定した。11個のBT16-Lクロー

題したが、その理由は、これらクローンは、LFA-3発現の均一細胞集団を示したからである。BAT-TH68メディアウム中に選別された6つのクローンは、HT16-L-1A、1B、1C、1、27、及び109-1は、PAC6分析によりLFA-3発現に対して検定された。発明者等は、対照CHO細胞の蛍光強度より35倍高かったクローンHT16-L-1C以外は、20-30倍の蛍光強度を示す極めてのクローンを見いだした。

発明者等はまた、HT16 cDNAからのLFA-3が、L-細胞中に発現された時に、H1.1細胞中に発現されたLFA-3に対して上記同じロゼット形成の検定を使用して、他の細胞に粘着するかどうか試験した。発明者等はロゼット形成を観察した。

大腸菌中にLFA-3の発現

大腸菌中にLFA-3 cDNAを発現する為に、発現ベクター-pLFA3ire1を構築した。このベクター(pKK238-3の誘導体)は、成熟LFA-3タンパク質を発現する。シグナル配列に対してコード付けするHT16 cDNAのDNA配列は、削除された。pLFA3ire1を構築する為に、プラスミド pKK238-3 [E. アマンとJ. プロフィウス, *Gene*, (遺伝子), 第40巻, 第183頁, (1985)] を制限酵素HcoIとBlnIで消化し、かつpLFA3HT16の単離100bp断片とBlnIの断片と2本鎖リンカー-LF21-22へ結合した。このリンカーは、HT16 cDNAの塩基対101-175 (Aa2部位へ)の間の配列を置換する(第1表)。

次に細胞は、32°Cで0p.p.m.まで、14 LB + 50 µg/mlアンピシリン中で増殖させた。LFA-3の発現は、2時間24h IPTGで誘導された。細胞は、30分間1000rpm/4°Cでベレットにされた。発明者等は、このベレットを、10mlトリス緩衝液当たり100細胞ベレットで25mMトリス(pH7.0)中に再分散し、細胞密度10,000-14,000/mlでフランス プレッシャー セル プレス中に溶解させた。次に膜分面を、4°Cで30分間10,000rpmにてSS31 ソルバール中で遠心分離により可溶性タンパク質から分離した。膜ベレットを、25mMトリス pH7.0の1ml、22アリコートの上清中に再分散させ、次に膜ベレットを、15%SDS-炭性PAGE上で電気泳動させた。膜ベレットを60%緩衝液に溶解し、タンパク質は、SDS-PAGE、汚染クローマー及びサブユニットタンパク質の配列決定用のゲルから切除されたLFA-3とにより分離された。発明者等のアミノ酸配列決定は、NFSQQIYGYYGKVT-LFA-3とFSQQIYGYYGKVT-LFA-3としてN-末端配列を確立し、これはヒト赤血球から精製したヒトLFA-3に対して決定したN-末端配列に一致した [バルナー等, *J. Exp. Med.* (ジャーナル エクスピリメンタル メディシン), 第166巻 第22頁(1987)]。従って、この精製により製造した生成物は、メチオニンを有する又は有しないN-末端を有する。

LF21:

```
3' CAYGTTTTCGCCAAGAAATATATGGTCTTGTCTATCGGG
TAACTTTCATGT ACCAAGCAATGTCCCTTT
AATAAGAG 3' 19 mer
```

LP22:

```
5' GACCTCTTTTAAACCCACATTCCTTGTCTACATGGAAA
ACATTCCTTACACACACACCATATATTTGT
GGCAAAA 3' 78 mer
```

発明者等は、得られた組換え発現ベクター細胞を形質転換した。pLFA3ire1で形質転換した大腸菌を1.0へ成長させ、続いて1時間14h IPTGで誘導遠心分離器により細胞を収束した。細胞を33中に相当量の0.2 OD₅₅₀を除去した。次いで発明者等は、器によりベレットとし、この細胞ベレットを60%の緩衝液50 µl中に再分散し、次いで30分間再分散した試料を、電気泳動によりタンパク質を分離する2変性ポリアクリルアミドゲルに装填した。LFA-3を、タンパク質をニトロセルロース膜へ電気泳動して抗体のL-LFA-3、Y64(キム スプリングゲルの贈り物)の1:1000希釈で膜を培養した。発明者等は、抗-抗体は25 kDタンパク質を検出し、形質転換細胞が異なったことを示したことを観察した。

LFA-3の欠失

50 µgのプラスミドpHT16LFA3 DNAを、32°C制限酵素BclIの100ユニットで消化した。発明者等は、アガロースゲル上電気泳動によりホストプラスミド、消化プラスミドを分離し、ゲルから切除し、電気泳動のアリコートの50 µlのpHT16LFA3プラスミドDNAを、BclIと100ユニットBlnIで32°Cにて1時間消化した。プラスミド中の大部分のLFA-3 cDNA配列を切除してベクターを、1%アガロースゲル上で電気泳動し、BlnI断片から分離し、切除し、次いで電気泳動し、発明者等は、欠失を導入する為に、オキチドLFA3を使用した。これは、第3図に示した1列の塩基対682で開始する21ヌクレオチドと塩基対開始する22ヌクレオチドに相当する43 mer(第1表)である。

LF15:

```
8' TAGGGTTCTGTCGCGCTGTAAGCTTACTTACCAATAAGAC
```

LF17:

(第11表続き)

LF28:

5' CAGGGCCCGCCCGCGTCGCTCCCAAGCAAC 3' 80 mer

1

このオリゴヌクレオチドが、一本鎖HT16cDNAに対してハイブリッド形成される時に、これはHT16cDNAの111塩基対の外にループ形成するだろう。電気泳動Sealの20pセルとDeor1/HindIII断片の20pセルは、燐酸化LP17の20pセルと混合され、次いで100mM KCl、8mM トリス(pH 7.5)及び30mM MgCl₂中で5分間30℃にて遠達され、87℃で1時間、4℃で1時間、次いで氷上で10分間培養することにより得変性された。反応混合物の半分に、発明者等は、0.5μg イリガーゼ、1mM ATP、1μM クレノウ及び50mM BTPを添加し、次いで混合物を一晩15℃で培養した。反応混合物の他の半部分を、MC1051造格細胞中に転移させた。欠失LFA-3 cDNAを含むコロニーを、次のように、LF17にハイブリッド形成することにより同定した。形質転移したMC1051コロニーを、ニトロセルロースフィルターに移し、溶解し次いでDBAを0.5M NaOHで処理することにより変性した。ニトロセルロースフィルターは、一晩85℃で、1x10⁵cpa/ml ³²P-キナーゼオリゴヌクレオチド LF17を含むP5B中でハイブリッド形成させた。フィルターを0.1xSSC (0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M グエン酸ナトリウム)中で洗淨し、1-膜フィルムに露光させた。正コロニーを、拾い上げ次いで37℃で増殖し、次いで溶解した。次いで発明者等は、DBAを調製した[マニフェス等、分子クローニング、実験室マニュアル、コールドスプリングハーバー(1982)参照]。

次に発明者等は、総ての除去したLFA-3 cDNAを、選択標的を更に追跡する発現ベクター中に挿入した。発明者等は、組込み中にLFA-3遺伝子に近接する同じプラスミド上に、選択標的を有することは、これら2つの遺伝子の共通点と、従って、これらの共選択を確実にすることであることを信じる。発明者等は、発現ベクターpJ03-e2を使用した。ベクターpJ03-e2は、1985年5月28日に、メリーランド州、リンチカムのインビトロインターナショナル、カルチャーコレクションに預けられ、受け入れ番号171-10171が記録されている。LFA-3M17、M16及びM23の構築の為に、pJ03-e2ベクターを制限酵素SalIにより線状化し、クレノウにより平滑末端とし、クレノウ-ブラント末端PstI断片のpLFA3M17、pLFA3M16又はpLFA3M23により連結した。次ぎに夫々の連結反応混合物を、MC1051中に形質転換し、夫々のDNAを含むコロニーを、オリゴヌクレオチドプローブ(第11表表続き)、HT16 cDNAの塩基対26-69に相補の20マーへLF28 P5B中で65℃でハイブリッド形成することにより選択し、65℃で0.5xSSC(0.75M KCl、0.075M NaCl)にて洗淨した。正コロニーを拾い上げ、LB - 2x50 μg/ml中で一晩増殖させ、かくしてDBAを調製した。挿入断片の正確な大きさは、制限酵素マッピングにより確認された。pLFA3M17の3つのクローン、

正確な欠失を証明する為に、DBAをEcoRIとHindIIIで消化し、4つのpLFA3M17コロニーが、正確な制限パターンを有する一つのクローンの正確なDBA配列を、マクスマとギル、の方法(特許文献)を使用してDBA配列決定により確認

LFA-3M18

プラスミドpLFA3M18-2-40を、欠失を導入するオリゴヌクレオチドLF16(第11表)を運用した以外は、3M17に対して本質的に記載したようにして作成した。21ヌクレオチド塩基対652-653(第3図)に対して相補、かつ21ヌクレオチド塩基対716-731(第3図)に対して相補であるところの42mer(マー)である。ヌクレオチドLF16による変位誘発は、LFA-3の線状化、質通領域に対してコード付けする18塩基対配列を除去細胞質の領域を低減のまゝにされた。発明者等は、pLFA3M16を分離し、かつ上記のようにその正確な証明した。

LFA-3M23

プラスミドpLFA3M23をpLFA3M17に対して記載法により構築した。変位誘発に対して使用したオリゴヌチドは、LP28(第11表)であって、その41マーは、21ヌチド塩基対641-651(第3図)に対して相補であり、20ヌクレオチド塩基対767-786(第3図)で相補であるところの61マーである。LP28による変位、変位誘発領域及びHT16-LFA-3の細胞質領域を除去し

安定なCHO細胞系を確立する為に、PstIで線状化されたpLFA3M17の10μgを、培養カルシウム液と前記エタノールによりCHO細胞中に移入した。同じ方法でpLFA3M16とpLFA3M23で安定CHO細胞系を確立する為にした。

pLFA3M17で移入されたCHO細胞は、¹²⁵Sメチオニン代謝標識化することにより可溶性LFA-3の分泌に対してされた。6ウェルプレートのウェル当たり5x10⁵細胞がメチオニンで18時間標識化され、かつ¹²⁵S-LFA-3を測定で沈殿させた。発明者等は、M17/CHOがLFA-3を分泌しを観察した。このことは、より高い発現を得る為に、M17/CHOはメトトレキサートの高い濃度中で増殖される。LFA-3遺伝子を増殖するのが良いことが理解されるべきである。

上記の発明を更に可能にする為に、発明者等の発明のLFA-3 DNA配列を担持する次のファージを、リンチカムのインビトロインターナショナル、カルチャーコレクションに1987年5月28日に預けた:

λ HT16 [λ L10/LFA-3]

このファージは、発明者等の発明のLFA-3 DNA配列を担持する。

猪表平2-501112

隨 單 提 及 帳 告

[illegible]

707/1588/01124

H. PROCEEDINGS CONFERENCED TO BE PRESENTED		CONFERENCE AND THE PROCEEDINGS	
Conference: Conference on the Proceedings of the Conference		Conference on the Proceedings	
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, Issued Nov 1984, (Washington, D.C.) Molecular Cloning of the Human T-lymphocyte surface CD22 cell antigen" see page 8710-8722, see particularly page 8715.	1-11	
X.M	Id. of Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 166, Issued Oct. 1987, (Amsterdam, Netherlands), (Belugas et al.), "Deficiency of Lymphocyte Surface Associated Antigen 1 (LPA3) in Perinatal Dystonia Hemoglobinuria" see pages 1921-1925. see particularly pages 1921-1922.	16-20	
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 79, Issued Dec 1982 (Washington, D.C.), (Zander-Kindler et al.), "Three distinct antigens associated with human T-lymphocytes mediated cytotoxicity LPA-1, LPA-2, LPA-3" pages 7489-7493.	1-11	
X.E	Nature, Vol. 329, Issued 29 Oct. 1987 (Tokyo, Japan, (S&D)), "An M2A-3 cDNA encodes a phospholipid linked membrane protein homologous to its receptor (CD2) pages 840-844.	1-15	
A	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, Issued Jan, 1984, (Washington, D.C.) "Immunoprecipitation of cell surface structures of cloned cytotoxic T lymphocytes by clone-specific antisera" pages 313-317.		
Y	J. of Immunology, Vol. 138, 1 June 1987 (Washington, D.C.), (Mikawa et al.), "Human T cell receptor is defined by LFA2 on erythrocytes" pages 3507-3509.	18-20	

ATTACHED IS PCT/JEN/210
PAGE 51.

GROUP 1: Clones 1-15 drawn to DNA sequences, vectors, host cells, polypeptide and a method of making the polypeptide.

Group VI: Claims 16-17 appear to be pharmaceutical compositions and a method of treating patients.

Group III: Cited 19-20 drawn to a diagnostic composition and a method of use.

the 1990s, the number of people in the world who are under 15 years of age is expected to increase by 1.5 billion, from 1.1 billion in 1990 to 2.6 billion in 2010. The number of people aged 65 and over is expected to increase by 1 billion, from 350 million in 1990 to 1.4 billion in 2010. The number of people aged 15-64 is expected to increase by 1.5 billion, from 2.5 billion in 1990 to 4.0 billion in 2010. The number of people aged 65 and over is expected to increase by 1 billion, from 350 million in 1990 to 1.4 billion in 2010. The number of people aged 15-64 is expected to increase by 1.5 billion, from 2.5 billion in 1990 to 4.0 billion in 2010.

第1頁の続き

⑤Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
C 12 N 1/21 5/10		7421-4B
C 12 P 21/02	C	8214-4B
G 01 N 33/53	K	7906-2C
C 12 N 1/21		
C 12 R 1:10		
(C 12 P 21/02		
(C 12 R 1:10		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:10		

②発明者	スプリンガー, テイモシー エイ	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02167、ニュートンノック ロード 28
②発明者	ヘツシヨン, キヤサリン	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02190、サウス ウス、6、フアンティン レーン 98
②発明者	テイザード, リチャード	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー デー - 3、ハーバード ストリート 334
②発明者	マタリアノ, ロバート	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02158、ニュートン ト サイド パークウェイ 114
②発明者	ダステイン, マイケル エル	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02215、ボストン、メント 23、パーク ドライブ 231
⑥出願人	デイナーフアーバー キヤンサー インステイチュート インコーポレイテッド	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02115、ボストン、ストリート 44

⑥出願人	ウオルター, バーバラ ビー	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー ストリート 7
⑥出願人	スプリンガー, テイモシー エイ	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02167、ニュートンノック ロード 28
⑥出願人	ヘツシヨン, キヤサリン	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02190、サウス ウス、6、フアンティン レーン 98
⑥出願人	テイザード, リチャード	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー デー - 3、ハーバード ストリート 334
⑥出願人	マタリアノ, ロバート	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02158、ニュートン ト サイド パークウェイ 114
⑥出願人	ダステイン, マイケル エル	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02215、ボストン、メント 23、パーク ドライブ 231